

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/24, C07K 14/54, C12N 15/63, 15/57, 9/48, 7/01, 5/10, C12P 21/02, A61K 38/20 // (C12P 21/02, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/07851</p> <p>(43) 国際公開日 1999年2月18日(18.02.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03524</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月7日(07.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/213754 1997年8月7日(07.08.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)(JP/JP) 〒103-8666 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 岡野文義(OKANO, Fumiyoshi)(JP/JP) 〒457-0866 愛知県名古屋市南区三条2-2-31-208 Aichi, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> <p>COPY</p>
<p>(54)Title: CANINE INTERLEUKIN 18, CANINE INTERLEUKIN 1β CONVERTASE, DNA SEQUENCES ENCODING THE SAME, PROCESS FOR PRODUCING INTERLEUKIN 18, AND REMEDIES FOR CANINE IMMUNOLOGICAL DISEASES</p> <p>(54)発明の名称 イヌインターロイキン18、イヌインターロイキン1β変換酵素、これらをコードするDNA配列、インターロイキン18の製造方法およびイヌの免疫疾病治療薬</p> <p>(57) Abstract Canine interleukin 18, a process for producing the same in insect cells or larvae, etc. The canine interleukin 18 has at least one capability selected from among the capability of acting on canine leukocytes to thereby induce an antiviral activity factor and a factor potentiating the expression of class II MHC on canine tumor cells, the one of promoting the proliferation of canine lymphocytes, the one of injuring and killing canine lymphocytes and canine tumor cells, the one of lessening tumors in vital canine bodies, and the one of activating canine leukocytes to thereby suppress canine allergy.</p>		

(57)要約

本願発明は、イヌインターロイキン18、イヌインターロイキン18β変換酵素、これらをコードする遺伝子、イヌインターロイキン18を昆虫細胞又は幼虫で生産させる製造方法及びイヌの免疫疾病治療薬等に係るものである。

前記イヌインターロイキン18は、イヌ白血球に作用して抗ウイルス活性因子及びイヌ腫瘍細胞上のクラスII MHCの発現を増強する因子を誘導する能力、イヌリンパ球の増殖を促進する能力、イヌリンパ球及びイヌ腫瘍細胞を傷害し死滅させる能力、イヌ生体に発生した腫瘍を縮小させる能力、及びイヌ白血球を活性化してイヌのアレルギーを抑制する能力から選ばれる少なくとも1つの能力を有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第十頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ			TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

イヌインターロイキン 18、イヌインターロイキン 1 β 変換酵素、
これらをコードする DNA 配列、インターロイキン 18 の製造方法
およびイヌの免疫疾病治療薬

技術分野

本発明は、蛋白質の一次構造がイヌの遺伝情報由来であるイヌインターロイキン 18 を遺伝子操作技術により量産し、以って動物用医薬品（抗腫瘍・抗アレルギー・抗ウイルス・ワクチンアジュバント）とする事を目的とした、組換えベクター、組換えウイルス、形質転換体、イヌインターロイキン 18、イヌインターロイキン 1 β 変換酵素およびインターロイキン 18 の製造方法に関する。

背景技術

免疫調節作用を示すインターロイキン 12（以下 IL 12 と略記する）は、インターフェロン γ 誘導活性、ナチュラルキラー細胞および 1 型ヘルパー T 細胞を活性化するなどの生理活性作用を有するサイトカイン（文献 1）で、特に細胞性免疫の強力な活性化作用により、抗腫瘍薬や抗アレルギー薬の候補として非常に有望視されている（文献 2、3）。インターロイキン 18（以下 IL 18 と略記する）も IL 12 と同様の活性を示すサイトカインとして最近クローニングされ（文献 4）、IL 12 との共同作用によりそれらの活性がさらに強まることが報告されている（文献 5）。

遺伝子操作技術によりマウスの IL 18（文献 4）に続き、ヒトの IL 18 の cDNA もクローニングされ（文献 6）、その遺伝子組換え手法を用いた量産化が検討されている。しかしながら、IL 18 は細胞内から分泌されるためのシグナル配列を持たず、そのため細胞内から活性型で分泌するためには、インターロイキン 1 β 変換酵素（以下 ICE と略記する）による IL 18 前駆体タンパクの

プロセッシングが必要で、IL18の遺伝子を単独で動物細胞に導入しても活性型IL18として発現せず（文献7）、細胞を用いた組換え型IL18の効率的な大量生産は困難であった。

IL18の遺伝子組換え手法を用いた量産により、腫瘍やアレルギー、ウイルス病などの治療薬としての開発が期待される。

また、ヒトと同様ペット、特にイヌにも、乳腺腫瘍など多数の腫瘍、アレルギー性の皮膚炎、パルボウイルス感染症、ジステンバー感染症など多数のウイルス病などが知られており、その治療薬の開発が求められている。

イヌのIL18がクローニングされたという報告は未だない。そこで、イヌIL18がクローニングされれば、新たなイヌの治療薬となる可能性がある。

また、IL18を細胞で遺伝子組換え手法を用いて容易に量産することが可能になれば、ヒトをはじめ、動物の抗腫瘍薬、抗アレルギー薬、抗ウイルス薬など、IL18としての用途が開かれることが期待される。

本発明者は、かかる状況に鑑み、イヌIL18のcDNAのクローニングおよびIL18遺伝子の大量発現を目的とし、創意工夫を成し、イヌのcDNAからイヌIL18をコードする遺伝子をクローニングすることに成功し、またIL18の前駆体タンパクをコードするDNAを含む組換えバキュロウイルスを作製し、これを昆虫細胞または幼虫に感染させることによって驚くべきことにICEの処理無しに活性型IL18が生産されることを見出し、また、活性型イヌIL18をコードする遺伝子の前にシグナル配列をコードする遺伝子を付加した遺伝子を作製することにより、更に活性型IL18の生産量が向上することを見出した。更にはイヌのcDNAからイヌICEをコードする遺伝子をクローニングすることに成功し、イヌIL18の前駆体タンパクをコードするDNAとイヌICEをコードするDNAを同時に含む組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞または幼虫に感染させることによってイヌIL18の大量生産にも成功し、以って簡単に大量にIL18を製造する方法を確立し、かくして本発明を完成させるに至った。

発明の開示

すなわち本発明は、イヌ白血球に作用して抗ウイルス活性因子およびイヌ腫瘍細胞上のクラスⅡMHCの発現を増強する因子を誘導する能力、イヌリンパ球の増殖を促進する能力、イヌリンパ球およびイヌ腫瘍細胞上のFasリガンドの発現を増強させる能力、イヌ腫瘍細胞を障害し死滅させる能力、イヌ生体に発生した腫瘍を縮小させる能力、およびイヌ白血球を活性化してイヌのアレルギーを抑制する能力から選ばれる少なくとも1つの能力を有するイヌインターロイキン18に関する。

さらに本発明は、IL18を生産させる組換えベクター、これらの組換えベクターを有する大腸菌の形質転換体、および昆虫細胞または幼虫でIL18を生産させる組換えバキュロウイルス、並びにこれらから得られるIL18、また、IL18の製造方法を提供するものである。さらに本発明はイヌIL18をコードする遺伝子、イヌICEおよびイヌICEをコードする遺伝子も提供する。さらに、IL18を含むイヌの免疫疾病治療薬を提供する。

発明を実施するための最良の形態

本発明のイヌIL18をコードするDNAを組み込んだ組換えベクターは例えば次のようにして製造することができる。すなわち、イヌの細胞からポリ(A)RNAを抽出した後、cDNAを合成し、マウスやヒトのIL18をコードする遺伝子配列を元にしたプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下PCRと略す）を行い、さらに合成したcDNAよりファージライブラリーを作製し、PCRによって得られた遺伝子断片とブランクハイブリダイゼーションを行うことにより、イヌIL18cDNAの全長をクローニングすることができる。イヌICEcDNAの全長も同様にしてクローニングすることができる。

イヌの臓器などよりRNAを得る方法としては、通常の方法、例えば、ポリソームの分離、ショ糖密度勾配遠心や電気泳動を利用した方法などがあげられる。上記イヌ臓器やイヌ細胞よりRNAを抽出する方法としては、グアニジン・チオシアネート処理後CsCl密度勾配遠心を行うグアニジン・チオシアネート塩

化セシウム法（文献 8）バナジウム複合体を用いてリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤で処理したのちフェノール抽出を行う方法（文献 9），グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート・グアニジン塩酸法、グアニジン・チオシアネート・フェノール・クロロホルム法、グアニジン・チオシアネートで処理したのち塩化リチウムで処理して RNA を沈殿させる方法などの中から適当な方法を選んで行うことができる。

イヌ臓器やマイトジェンなどで刺激されたイヌ単核球やリンパ球より通常の方法、例えば、塩化リチウム／尿素法、グアニジン・イソチオシアネート法、オリゴ d T セルロースカラム法等により mRNA を単離し、得られた mRNA から通常の方法、例えば、Gubler らの方法（文献 10），H. Okayama らの方法（文献 11）等により cDNA を合成する。得られた mRNA から cDNA を合成するには、基本的にはトリ骨芽球ウイルス（AMV）などの逆転写酵素などを用いるほか 1 部プライマーを用いて DNA ポリメラーゼなどを用いる方法を組み合わせてよいが、市販の合成あるいはクローニング用キットを用いるのが便利である。

この cDNA を鋳型としてマウスやヒトの塩基配列をもとにしたプライマーを用いて PCR を行い、さらに合成した cDNA を λファージベクターに連結した後、インビトロで λファージのコート蛋白質などと混合することによりパッケージングし、その生成されたファージ粒子を宿主となる大腸菌に感染させる。この際、λファージの感染した大腸菌は溶菌し、1 個 1 個のクローンがプラークとして回収される。このプラークをニトロセルロースなどのフィルターに移し、放射標識した PCR で得た遺伝子をプローブとしたハイブリダイゼーションにより、イヌ IL18 やイヌ ICE をクローニングすることができる。

宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌（*Escherichia coli*），バチルス属（*Bacillus*）細菌、例えばバチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス（*Saccharomyces*）属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエー（*Saccharomyces cerevisiae*）等の真核性微生物、

昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞 (*Spodoptera frugiperda*)、キャベツルーパー細胞 (*Trichoplusia ni*)、カイコ細胞 (*Bombyx mori*)、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーパー等を用いることもできる。

発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウイルス (バキュロ (昆虫)、ワクチニア (動物細胞)) 等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細胞に依存して選択され、例えば細菌用プロモーターとしては *lac* プロモーター、*trp* プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば *adh1* プロモーター、*pqk* プロモーター等が使用される。また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター、*p10* プロモーター等、動物細胞としては *Simian Virus 40* の *early* または *late* プロモーター等があげられるが、これらに限定されない。

発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons 社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。

IL18 を細胞を用いて生産する場合、その前駆体タンパクにシグナル配列が存在しないため、ICE などによる IL18 前駆体タンパクのプロセッシングが必要である。そのため、IL18 前駆体タンパクと ICE を同時に発現させることによって活性型 IL18 が生産できる。例えば、配列番号：2 に示すイヌ ICE をコードする遺伝子とイヌ IL18 をコードする遺伝子を同時に含む発現ベクターを用いることによって活性型イヌ IL18 を細胞で生産することができる。

また、活性型 IL18 をコードする遺伝子の前にシグナル配列をコードする遺伝子を付加することによって活性型 IL18 が生産できる。例えば、配列番号：9 に示すようにシグナル配列をコードする遺伝子を含む遺伝子を用いることによって活性型イヌ IL18 を細胞で生産することができる。

イヌ IL18 は、例えば、カイコに感染する組換えカイコ核多角体病ウイルス

を作製することによって、カイコ発現系を用いて生産することができる。組換えカイコ核多角体病ウイルスは、イヌ１Ｌ１８の蛋白質をコードするＤＮＡをカイコのクローニングベクターに連結して作製した組み換え体プラスミドとカイコ核多角体病ウイルスＤＮＡとを、カイコ樹立細胞にコトランスフェクションして作製することができる。従って、組み換え体ウイルスは、*in vivo*的な方法で作製することができる。

すなわち、イヌ１Ｌ１８の蛋白質をコードするＤＮＡ部分を、例えば

BK283

などのカイコのクローニングベクターの発現調節部分の下流に連結するという一般的な遺伝子操作に従って組換え体プラスミドを作製することができる。この組換え体プラスミドとカイコ核多角体病ウイルスＤＮＡ（文献１２）とを、文献のような方法でカイコ樹立細胞、例えばBM-N株（文献１２）にコトランスフェクションした後、培養を続け、培養液中に出現した非組換え体（野性型）と組換え体のウイルスの中から限界希釈法、もしくはブランク法などの一般的な方法によって組換え体ウイルスをクローニングすることができる。組換え体ウイルスは多角体の形成能がないことから、野性型ウイルスと容易に区別できる。イヌ１Ｌ１８の生産は、前記の組換えカイコ核多角体病ウイルスをカイコ樹立細胞中、またはカイコ生体中で増殖させることにより行なう。

カイコ樹立細胞を用いる場合は、前記組換え体ウイルスを含む培養液により、BM-N細胞を感染させ、平面培養または浮遊培養により培養する。BM-N細胞を培養する培地としては、例えば牛血清を添加したTC-10培地（文献１２）を使用することができる。培養温度は25～28℃が適当である。培養後、培液を遠心分離しその上清からイヌ１Ｌ１８を回収する。

カイコ生体を用いる場合は、前記の組換え体ウイルスを含む培養液をカイコ幼虫に注射して、合成飼料を与えて飼育する。飼育後、体液を採取しその上清からイヌ１Ｌ１８を回収する。

産生されたイヌ１Ｌ１８タンパクは、非還元下、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により決定すると、見かけの分子量が約15～20kDである。

イヌ１Ｌ１８は、以下の実施例で示すように、イヌ白血球からのイヌIFN γ

の誘導能、腫瘍細胞上の Fas リガンド分子の発現増強能、イヌ腫瘍細胞に対する抗腫瘍作用などの活性により特性化される。イヌ IFN γ の活性は CPE 法（文献 14）を用いた抗ウイルス活性およびイヌ腫瘍細胞上のクラス II MHC 分子の発現増強活性により測定する。腫瘍細胞上の Fas リガンド分子の発現増強活性およびクラス II MHC 分子の発現増強活性は、蛍光を標識したそれら分子に対する抗体を細胞に反応させ、フローサイトメーターなどの蛍光強度を測定できる装置によって蛍光の強度を測定し、それが 10% 以上上昇した場合に活性があると判定できる。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1

イヌ IL18 のクローニング

(1) イヌ cDNA の調製

イヌ脾臓、腎臓、肝臓および鶏ニューカッスル病ウイルスで 7 時間処理したイヌ脾臓由来リンパ球より ISOGEN（ニッポンジーン社製）を用いて総 RNA を調製した。得られた RNA を 1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）（以下 TE と略記する）に溶解し、70℃で 5 分間処理した後、1 M LiCl を含む TE を同量加えた。0.5 M LiCl を含む TE で平衡化したオリゴ dT セルロースカラムに RNA 溶液をアプライし、同緩衝液にて洗浄した。さらに 0.3 M LiCl を含む TE にて洗浄後、0.01% SDS を含む 2 mM EDTA（pH 7.0）で吸着したポリ（A）RNA を溶出した。こうして得られたポリ（A）RNA を用いて一本鎖 cDNA を合成した。すなわち、滅菌した 0.5 ml のマイクロ遠心チューブに 5 μ g のポリ（A）RNA と 0.5 μ g のオリゴ dT プライマー（12-18 mer）を入れ、ジエチルピロカルボネート処理滅菌水を加えて 12 μ l にし、70℃で 10 分間インキュベートしたのち氷中に 1 分間つけた。これに 200 mM トリス塩酸（pH 8.

4), 500 mM KCl 溶液を 2 μ l, 25 mM MgCl₂ を 2 μ l, 10 mM dNTP を 1 μ l および 0.1 M DTT を 2 μ l それぞれ加え、42°C で 5 分間インキュベートしたのち、200 ユニットの Gibco BRL 社製 SuperScript II RT を 1 μ l 加え、42°C でさらに 50 分間インキュベートして cDNA 合成反応を行った。さらに 70°C で 15 分間インキュベートして反応を停止し、氷上に 5 分間置いた。この反応液に 1 μ l の E. coli RNase H (2 units/ml) を加え、37°C で 20 分間インキュベートした。

(2) イヌ cDNA フェージライブラリーの調製

上記(1)で得られたポリ(A) RNA 1 μ g づつを用い、ファルマシア社のタイムセーバー cDNA 合成キットにて添付のマニュアルに従い、オリゴdT プライマーを用いて 2 本鎖 cDNA を合成し、さらに EcoRI/NotI アダプターを連結した。これを用いて、アマシャム社の cDNA ラビットクロニングモジュール λ gt10 にて添付のマニュアルに従い、組換え λ gt10 ベクターを作製し、さらにアマシャム社のインビトロパッケージングモジュールにて添付のマニュアルに従い、組換え体フェージを作製した。

(3) イヌ IL18 の cDNA クローニング

マウス IL18 の塩基配列 (文献 4) をもとに、

5'-a a c t t t g g c c g a c t t c a c t g t a c a a c c g c a g t a
a t a c g g a 3' (配列番号 5)

と

5'-c c t t c a t a c a g t g a a g a t t c a a a c t c c a t c t t g t
t g t g t c 3' (配列番号 6)

の 2 種類のプライマーを DNA シンセサイザーにて合成した。上記(1)のイヌ肝臓より得られた cDNA を 0.5 ml のマイクロ遠心チューブに 2 μ l 取り、各プライマーを 20 pmol, 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、1.5 mM MgCl₂、25 mM KCl, 100 μ g/ml ゼラチン、50 μ M

各 dNTP、4 単位 Taq DNA ポリメラーゼとなるように各試薬を加え、全量 100 μ l とする。DNA の変性条件を 94 $^{\circ}$ C、1 分、プライマーのアニーリング条件を 45 $^{\circ}$ C、2 分、プライマーの伸長条件を 72 $^{\circ}$ C、3 分の各条件で MJ RESEARCH 社の Programmable Thermal Controller を用い、40 サイクル反応させた。これを 1% アガロースゲルにて電気泳動し、約 360 bp の DNA 断片を常法（文献 13）に従って調製した。

この DNA 断片を Invitrogen 社の T-Vector に宝酒造（株）の DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて連結した。これを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミド DNA を常法により調製した。次にこのプラスミドに PCR 断片が挿入されていることを前述と同じ条件の PCR によって確認し、蛍光 DNA シーケンサー（パーキンエルマー社製 DNA シーケンサー 373 S）を用い、その添付プロトコールに従って、パーキンエルマー社のダイターミネーターサイクルシーケンシングキットを用いて、挿入した DNA の塩基配列を決定した。次に、この配列を含む、360 bp の DNA 断片に宝酒造（株）の Random Primer DNA Labeling Kit を用いて 32 P で標識し、プローブを作製した。上記（2）で得られたイヌ肝臓 cDNA から作製した組換え体ファージライブラリーを大腸菌 NM514 上でブラックとして形成させ、アマシャム社の Hybond-N+ に常法に従って転写した。Hybond-N+ は、5 \times SSPE（0.9 M NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 , 5 mM EDTA, pH 7.4）、5 \times デンハルト溶液（0.1% フィコール、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% ウシ血清アルブミン）、0.1% SDS、100 μ g/ml サケ精子 DNA 中、65 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし、ついで同じ溶液中で上述のようにして作製した標識プローブ 1 \times 10⁶ cpm/ml とハイブリダイズした。65 $^{\circ}$ C で 1 晩インキュベートした後、Hybond-N+ を 0.2 \times SSC（30 mM NaCl, 3 mM クエン酸ナトリウム）、0.1% SDS 中 15 分、3 回洗浄し、富士写真フイルム（株）の富士イメージングプレートに 12 時間露出し、富士写真フイルム（株）のバイオイメージングアナライザーにて解析した。陽性のシグナルを有するブラックは常法に従い、再スクリーニングを行った。3 回のスクリーニング

の結果、陽性シグナルを有する1個の組換え体ファージを得た。この組換え体ファージより常法に従ってファージDNAを抽出し、制限酵素EcoRIで切断した後、1%アガロースゲル電気泳動にて得られた約1.4 kbのDNA断片を常法に従い調製し、宝酒造(株)のDNA Ligation Kit Ver. 2を用いて、宝酒造(株)のpUC118BAP処理DNA(EcoRI/BAP)と連結した。これを用いてプラスミドDNAを常法により調製し、蛍光DNAシーケンサー(パーキンエルマー社製DNAシーケンサー373S)を用い、その添付プロトコールに従って、パーキンエルマー社のダイターミネーターサイクルシーケンシングキットを用いて、得られた約1.4 kbのDNA断片の塩基配列を決定した。このうち、イヌIL18の前駆体をコードする配列を配列番号: 1に、全塩基配列を配列番号: 3に示す。

(4) イヌICEのcDNAクローニング

ヒトICEの塩基配列(文献15)をもとに、

5'-atggccgacaagggtcctgaaggagaaagagaaagc
tgttt3' (配列番号7)

と

5'-atgtcctgggaaggtagaaacatcttggtcaaa
gtcac3' (配列番号8)

の2種類のプライマーをDNAシンセサイザーにて合成した。上記(1)の鶏ニューカッスル病ウイルスで処理したイヌ脾臓由来リンパ球より得られたcDNAを0.5 mlのマイクロ遠心チューブに2 µl取り、各プライマーを20 pmol, 20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)、1.5 mM MgCl₂、25 mM KCl, 100 µg/mlゼラチン、50 µM各dNTP、4単位 Taq DNAポリメラーゼとなるように各試薬を加え、全量100 µlとする。DNAの変性条件を94℃、1分、プライマーのアニーリング条件を55℃、2分、プライマーの伸長条件を72℃、3分の各条件でMJ RESEARCH社のProgrammable Thermal Controllerを用い、35サイクル反応させた。これを1%アガロースゲルにて電気泳動し、約1.2 kbのD

N A断片を調製した。上記（３）と同様にしてこのDNA断片の塩基配列を決定した後、この配列を含む1.2 kbのDNA断片を用いて標識プローブを作製した。上記（２）で得られた鶏ニューカッスル病ウイルスで処理したイヌ脾臓由来リンパ球より得られたcDNAから作製した組換え体ファージライブラリーを上記（３）と同様にして標識プローブとハイブリダイズし、スクリーニングを行った。その結果得られた陽性シグナルを有する1個の組換え体ファージよりDNAを抽出し、制限酵素Not Iで切断した後、1%アガロースゲル電気泳動にて得られた約1.5 kbのDNA断片をSTRATAGENE社のpBlue script IIのNot Iサイトに常法に従い連結した。これを用いてプラスミドDNAを調製し、蛍光DNAシーケンサーを用いて、得られた約1.5 kbのDNA断片の塩基配列を決定した。このうち、イヌICEをコードする配列を配列番号：2に、全塩基配列を配列番号：4に示す。

実施例 2

イヌIL18の生産

（１）イヌIL18の大腸菌での生産

実施例1で得られたイヌIL18の前駆体タンパクをコードするDNAを鋳型とし、制限酵素Nco IおよびBam H I切断部位を付加したプライマーを用いてPCR法にてNco IおよびBam H I切断部位を付加した活性型イヌIL18タンパクをコードするDNA断片を調製した。このDNA断片を制限酵素で切断し、大腸菌発現ベクターであるpET8cのプロモーター下流の制限酵素Nco IおよびBam H I切断部位に連結した。これを用いて常法に従い大腸菌HB101を形質転換した。100 μ g/mlのアンピシリンを含むLBプレート上に生育するコロニーのうち15個を100 μ g/mlのアンピシリンを含む3 mlのLB培地中で8時間培養し、集めた菌体からプラスミドを抽出、精製後、制限酵素Nco IおよびBam H Iで切断し、約580 bpのDNA断片が得られた活性型イヌIL18をコードするDNA断片を含んだプラスミドを得た。この組換えベクターをpETCa I Gとし、これを用いて定法に従い、大腸菌BL21を形質転換した。この大腸菌をE. coli (pETCa I G)と名付けた。

得られた *E. coli* (pETCa1G) のシングルコロニーを $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 5 ml の LB 培地に植菌した。OD600 が約 0.7 になるまで 37°C で培養し、終濃度 0.5 mM のイソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えて、さらに 1.5 時間培養した。

培養液 1.5 ml を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに取り、 12000 rpm で 5 分間遠心後、上清を捨て、 1.5 ml の 10 mM トリス塩酸 ($\text{pH} 7.5$) に懸濁し、氷上にてハンディーソニックを用いて菌体を破碎した。 2000 rpm で 30 分間遠心し、可溶性画分 (上清) を得、 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過滅菌後、イヌ IL18 が生産された溶液を得た。

また、制限酵素 BamHI 切断部位を付加したプライマーを用いて PCR 法にて BamHI 切断部位を付加した活性型イヌ IL18 タンパクをコードする DNA 断片を調製し、制限酵素で切断後、大腸菌発現ベクターである pGEX-5X (ファルマシア社製) の BamHI 切断部位に連結し、上記と同様の操作により大腸菌 BL21 を形質転換後、可溶性画分を得た。この画分をグルタチオンセファロースカラム (ファルマシア社製) にアプライした。その溶出画分をファルマシア社製の Factor Xa を用いて切断し、さらに同じカラムにアプライした。カラムに結合しない活性型イヌ IL18 タンパクを含む画分を回収した。こうして精製された活性型イヌ IL18 タンパクは SDS-PAGE 解析によると、純度が 90% 以上であった。また、ワコー社のリムルステストキットを用いた解析によると、このタンパク 1 mg 中にエンドトキシンは全く検出されなかった。

(2) イヌ IL18 産生組換えバキュロウイルスの作製

バキュロウイルストランスファーベクター pVL1392 (ファーマンジェン社製) のプロモーター下流の制限酵素 PstI および EcoRI 切断部位にイヌ IL18 の前駆体をコードする配列番号: 1 に記載の DNA を常法に従って連結し、組換えトランスファーベクターを得た。さらにファーマンジェン社製のバキュロウイルストランスフェクションキットを用いてその添付マニュアルに従って、組換えバキュロウイルス rAcCa1G-1 を得た。

また、同様にして、シグナル配列を含む配列番号: 9 に記載の DNA を pVL

1392に連結し、組換えトランスファーベクターを作製し、組換えバキュロウイルス rAcCaIG-2を得た。

さらに、同様にして、バキュロウイルストランスファーベクター pAcAB3 (ファーミンジェン社製) のプロモーター下流の制限酵素 XbaI と BamHI 切断部位にそれぞれイヌIL18の前駆体をコードするDNAとイヌICEの前駆体をコードするDNAを連結し、組換えバキュロウイルス rpAcCaIGICEを得た。

(3) 昆虫細胞でのイヌIL18の生産

上記(2)で得られた rAcCaIG-1、rAcCaIG-2 および rpAcCaIGICE をファーミンジェン社製のバキュロウイルス Protein-Free Insect Medium で 75 cm^2 のフラスコでコンフルエントまで平面培養した Sf21 細胞 (Spondoptera frugiperda 由来、ファーミンジェン社製) にそれぞれ感染させ、4日間培養した後、イヌIL18が生産された培養上清を得た。

(4) カイコ生産用イヌIL18産生組換えバキュロウイルスの作製

トランスファーベクター pBK283 (フナコシ社製) のプロモーター下流の制限酵素 EcoRI 切断部位にイヌIL18の前駆体をコードするDNAを常法に従って連結し、組換えトランスファーベクターを得た。文献12の方法で組換えウイルスを作製した。すなわち、 50 mM HEPES バッファー (pH 7.1)、 0.28 M NaCl、 0.7 mM Na_2HPO_4 、 0.7 mM NaH_2PO_4 からなる 2.5 ml の溶液に、 2.5 ml のDNA混合液 (0.25 M CaCl_2 、カイコ核多角体病ウイルス BmNPV T3 株 (文献12) のDNA $10\text{ }\mu\text{g}$ 、組換えトランスファーベクター $65\text{ }\mu\text{g}$ を含む) を滴下し、生じた懸濁液 0.5 ml を 5 ml の 10% FBS を添加した TC-10 培地 (文献12) 中、 25 cm^2 のフラスコで平面培養した約 3×10^5 個の BmN 細胞の培養基に加え、カイコ細胞にDNAを導入した。20時間後、新鮮な培地と交換し、さらに7日間培養後、培養液を回収した。その培養液を遠心して清澄化した上清を希

釈して平面に培養したBM-N細胞の培養基に添加して8日間培養後、顕微鏡観察によりウイルス感染が見られ、かつ多角体が形成していない培養基を選択した(限界希釈法)。

限界希釈法を7回繰り返し、組換え体ウイルスrBmCa1Gを得た。

(5) カイコ生体中でのイヌIL18の生産

5令2日目のカイコ幼虫に、前記(3)で得た組換え体ウイルスのウイルス液を50 μ l/頭注射し、25 $^{\circ}$ Cで4日間、市販の人工飼料(カネボウシルクエレガンス社製)を与えて飼育後、10頭のカイコの腹部を切り、体液を氷冷したエッペンドルフチューブに採取し、遠心分離後の上清を得、0.22 μ mのフィルターでろ過滅菌後、イヌIL18が生産された体液を得た。

実施例3

イヌIL12の調製

(1) イヌIL12 cDNAの調製

LPS (50 μ g/ml) で48時間刺激したイヌ末梢血単核球よりISOG EN (ニッポンジーン社) を用いて総RNAを調製した。得られたRNAを1mM EDTAを含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)(以下TEと略する。)に溶解し、70 $^{\circ}$ Cで5分間処理した後、1M LiClを含むTEを同量加えた。0.5M LiClを含むTEで平衡化したオリゴdTセルロースカラムにRNA溶液をアプライし、同緩衝液にて洗浄した。さらに0.3M LiClを含むTEにて洗浄後、0.01% SDSを含む2mM EDTA (pH7.0) で吸着したポリ(A) RNAを溶出した。こうして得られたポリ(A) RNAを用いて一本鎖cDNAを合成した。すなわち、滅菌した0.5mlのマイクロ遠心チューブに5 μ gのポリ(A) RNAと0.5 μ gのオリゴdTプライマー(12-18mer)を入れ、ジエチルピロカルボネート処理滅菌水を加えて12 μ lにし、70 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートしたのち氷中に1分間つけた。これに200mM トリス塩酸(pH8.4), 500mM KCl溶液を2 μ l, 25mM MgCl₂を2 μ l, 10mM dNTPを1 μ lおよび0.1

M D T T を $2 \mu\text{l}$ それぞれ加え、 42°C で 5 分間インキュベートしたのち、 200 ユニットの G i b c o B R L 社製 S u p e r S c r i p t I I R T を $1 \mu\text{l}$ 加え、 42°C でさらに 50 分間インキュベートして c D N A 合成反応を行った。さらに 70°C で 15 分間インキュベートして反応を停止し、氷上に 5 分間置いた。この反応液に $1 \mu\text{l}$ の E . c o l i R N a s e H (2 u n i t s / m l) を加え、 37°C で 20 分間インキュベートした。得られた c D N A を鋳型として、イヌ I L 12 の塩基配列 (文献 16) をもとに、P C R 法によってイヌ I L 12 の P 40 サブユニットおよび P 35 サブユニットの各遺伝子を取得し、定法に従い、これらを発現ベクター p C D L - S R α 296 (文献 17) にそれぞれ連結し、F O C a I L 12 P 40 および F O C a I L 12 P 35 を得た。それぞれ $5 \mu\text{g}$ の F O C a I L 12 P 40 および F O C a I L 12 P 35 を 50 mM トリス塩酸緩衝液 (p H 7 . 5) 、 $400 \mu\text{g} / \text{ml}$ の D E A E デキストラン (フアルマシア製) および $100 \mu\text{M}$ のクロロキン (シグマ社) を含む 4 ml の E R D F 培地 (極東製薬 (株) 社製) に加えた。一方、直径 10 cm のディッシュを用いて 10% ウシ胎児血清 (ギブコ社、以下 F B S と略記する) で 50% コンフルエントになるまで増殖させた C O S - 1 細胞 (A T C C C R L - 1650) を P B S で一回洗浄した後、上記で得た 4 ml の D N A 混合液を加え、 $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C の条件で培養した。4 時間後、細胞を P B S で洗浄した後、 20 ml の E R D F 培地にて $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C の条件で 4 日間培養し、C a I L 12 が生産された培養上清を得た。

実施例 4 イヌ I L 18 の活性測定

実施例 2 で生産されたイヌ I L 18 の活性測定は以下のようにして行った。イヌ脾臓よりリンパ球を分離し、 10% の牛胎児血清 (F B S) を含む E R D F 培地 (極東製薬 (株) 製) に $10^6 \text{ cells} / \text{ml}$ の細胞密度で懸濁し、このうち 2.5 ml とヒト I L 2 (G e n z y m e 社製) 250 U を 6 cm ディッシュに添加した。これに実施例 2 (3) で得られたそれぞれの培養上清 2.5 ml を加え、 $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C の条件で 2 日間培養し、ウイルスとして V e s i c u l a r S t o m a t i t i s V i r u s , 感受性細胞として M D C K (A T C

C C C L - 3 4) を用い、文献 1 4 の C P E 法に従ってこの培養液の抗ウイルス活性を測定した。その結果、組換えウイルス r A c C a l G - 1 を感染させて得られた培養上清で約 10^4 希釈単位 / m l の抗ウイルス活性が検出され、組換えウイルス r A c C a l G - 2 および r p A c C a l G I C E を感染させて得られた培養上清で 10^5 希釈単位 / m l 以上の抗ウイルス活性が検出された。また、実施例 2 (1) および (5) で得られた大腸菌およびカイコ体液の抗ウイルス活性を同様にして測定した結果、それぞれ 10^3 、 10^5 希釈単位 / m l 以上の抗ウイルス活性が検出された。さらに、実施例 2 (1) で得られた大腸菌で生産した精製イヌ I L 1 8 と実施例 3 で得られたイヌ I L 1 2 が生産された培養上清を用いて、この抗ウイルス活性誘導能における、イヌ I L 1 8 とイヌ I L 1 2 の相乗作用を検討した。上記と同様にしてヒト I L 2 を含むイヌリンパ球培養液を調製し、これに精製イヌ I L 1 8 を $1 \mu g$ 添加したもの、イヌ I L 1 2 が生産された培養上清 2 . 5 m l を添加したもの、および精製イヌ I L 1 8 を $1 \mu g$ とイヌ I L 1 2 が生産された培養上清 2 . 5 m l を添加したものを比較検討した。その結果、イヌ I L 1 8 単独で約 10^5 希釈単位 / m l 、イヌ I L 1 2 が生産された培養上清単独で約 3×10^4 希釈単位 / m l 両方添加したもので、 10^6 希釈単位 / m l 以上の抗ウイルス活性が得られた。このことから、イヌ I L 1 8 とイヌ I L 1 2 は抗ウイルス活性誘導能において相乗作用を有することが判明した。

また、クラス I I M H C を発現したイヌ乳腺腫瘍組織由来細胞株 F C B R 1 を用いて、組み換えウイルスを感染させた S f 2 1 細胞の培養液およびカイコ体液中のクラス I I M H C の発現増強活性を測定した。6 c m ディッシュに、 10^5 個の F C B R 1 を接着させ、これに上記培養液およびカイコ体液で刺激したイヌリンパ球培養液を添加し、5 % C O ₂、3 7 ° C の各条件で 1 ユーブにて遠心した。これに、 $10 \mu l$ のラット抗イヌ M H C クラス I I モノクローナル抗体 (セロテック社製) を添加し、さらに $50 \mu l$ の 1 0 % の F B S を含む E R D F 培地で懸濁し、氷上で 1 時間静置した。P B S で洗浄した後、 $5 \mu l$ の F I T C 標識ラビット抗ラットモノクローナル抗体 (セロテック社製) および $50 \mu l$ の 1 0 % の F B S を含む E R D F 培地で懸濁し、氷上で 1 時間静置した。P B S で洗浄後、ベクトンディッキンソン (株) の F A C S c a n にて解析した。その結果、S f 2

1 細胞およびカイコで産生させたイヌ IL 18 は、イヌリンパ球を刺激して F C B R 1 上のクラス II M H C の発現量をそれぞれ約 15 %、35 % 上昇させた。これらのことから、イヌ IL 18 はイヌリンパ球に作用して、イヌ I F N γ を誘導する活性を有することが判明した。

次に F a s リガンドを発現した F C B R 1 を用いて、S f 2 1 細胞の培養液およびカイコ体液中の F a s リガンドの発現増強活性を測定した。ラビット抗ヒト F a s リガンドポリクローナル抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y 社製) と F I T C 標識マウス抗ラビットモノクローナル抗体 (セロテック社製) を用い、同様に F A C S c a n にて解析した。その結果、S f 2 1 細胞およびカイコで産生させたイヌ IL 18 は、F C B R 1 上の F a s リガンドの発現量をそれぞれ約 40 %、55 % 上昇させた。

また、S f 2 1 細胞の培養液およびカイコ体液中の抗腫瘍活性を検討した。S f 2 1 細胞およびカイコで産生させたイヌ IL 18 は F C B R 1 に作用して、細胞内 D N A の断片化を引き起こし、アポトーシスにより細胞を死滅させた。イヌ IL 18 はイヌ腫瘍細胞に対して直接、抗腫瘍活性を示すことが判明した。

さらに、イヌ IL 18 の *i n v i v o* での抗腫瘍活性を検討した。F C B R 1 を 4 週齢のスキットマウス (日本クレア社由来) の背部皮下に移植したところ、腫瘍を形成した 4 匹の担ガンマウスが作成できた。腫瘍重量を次の式にて算出した。

$$\text{腫瘍重量} = \text{長径} \times \text{短径}^2 / 2$$

移植から 2 ヶ月後、腫瘍の大きさが平均 32 mm X 19 mm、腫瘍重量で 5.8 g になったところで、3 匹のマウスに大腸菌で生産した実施例 2 (1) に記載の 10 μ g の精製イヌ IL 18 を 2 日間隔で 2 回、尾静脈より投与した。また同時にコントロールとして生理食塩水を 1 匹のマウスに投与した。コントロールのマウスの腫瘍重量は投与後さらに増加し、投与後 10 日目には 1.3 倍になった。一方、イヌ IL 18 を投与したマウスの腫瘍重量は投与後減少し、コントロールを 1 とした相対腫瘍重量で 0.05 から 0.1 になった。イヌ IL 18 のこの腫瘍退縮効果は抗マウスインターフェロン γ 抗体と抗アシアロ G M 1 抗体の同時投与によって阻害されなかった。イヌ IL 18 は *i n v i v o* においてもイヌ腫瘍

細胞に対して抗腫瘍活性を示すことが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、IL18を容易に量産することができる。さらに、イヌの疾病の治療などに有効なイヌIL18を提供できる。

参考文献

1. Wolfら: J. Immunol. 146, 3074-3081 (1991).
2. Shoenhautら: J. Immunol. 148, 3433-3440 (1992).
3. Nastalaら: J. Immunol. 153, 1697-1706 (1994).
4. Okamuraら: Nature 378, 88-91 (1995).
5. Micallefら: Eur. J. Immunol. 26, 1647-151 (1996)
6. Ushioら: J. Immunol. 156, 4274-4279 (1996).
7. Guら: Science 275, 206-209 (1997).
8. Chirgwinら: Biochemistry 18, 5294 (1979).
9. Bergerら: Biochemistry 18, 5143 (1979).
10. Gublerら: Gene 25, 236-269 (1983).
11. Okayamaら: Mol. Cell. Biol., 2, 161, (1982) & 3, 280, (1983).
12. Horiuchiら: Agric. Biol. Chem., 51, 1573-1580 (1987)
13. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1982.

14. 日本生化学会編：続生化学実験講座第5巻、(1986). P250-256、東京化学同人.
15. Thomberryら：Nature 356, 768-779 (1992).
16. Okanoら：J. Interferon and Cytokine Res. 17, 713-718 (1997).
17. Okayamaら：Mol. Cell. Biol., 2, 161, (1982) & 3, 280, (1983).

請求の範囲

1. イヌ白血球に作用して抗ウイルス活性因子およびイヌ腫瘍細胞上のクラス I MHC の発現を増強する因子を誘導する能力、イヌリンパ球の増殖を促進する能力、イヌリンパ球およびイヌ腫瘍細胞上の Fas リガンドの発現を増強させる能力、イヌ腫瘍細胞を障害し死滅させる能力、イヌ生体に発生した腫瘍を縮小させる能力、およびイヌ白血球を活性化してイヌのアレルギーを抑制する能力から選ばれる少なくとも 1 つの能力を有するイヌインターロイキン 18。
2. 配列番号：1 と同じあるいはその一部であるアミノ酸配列を有するイヌインターロイキン 18。
3. 配列番号：9 と同じあるいはその一部であるアミノ酸配列を有するイヌインターロイキン 18。
4. 請求項 1 または 2 または 3 に記載の蛋白質をコードする DNA 配列。
5. 配列番号：3 に記載の非コード領域を含む DNA 配列。
6. 請求項 4 に記載の DNA 配列あるいはその一部を有する DNA 配列を含む組換えベクター。
7. インターロイキン 1 β およびインターロイキン 18 の前駆体タンパクを切断し、それらを活性型にする能力を有するイヌインターロイキン 1 β 変換酵素。
8. 配列番号：2 と同じあるいはその一部であるアミノ酸配列を有するイヌインターロイキン 1 β 変換酵素。
9. 請求項 7 または 8 に記載の蛋白質をコードする DNA 配列。

10. 配列番号：4に記載の非コード領域を含むDNA配列。

11. インターロイキン18の前駆体タンパクをコードするDNA配列とインターロイキン1 β 変換酵素をコードするDNA配列を同時に含む組換えベクター。

12. 配列番号：1に示すDNA配列あるいはその一部を有するDNA配列と配列番号：2に示すDNA配列あるいはその一部を有するDNA配列を同時に含む組換えベクター。

13. インターロイキン18の前駆体タンパクをコードするDNA配列を含む組換えバキュロウイルス。

14. 配列番号：1に示すDNA配列あるいはその一部を有するDNA配列を含む組換えバキュロウイルス。

15. 配列番号：9に示すDNA配列あるいはその一部を有するDNA配列を含む組換えバキュロウイルス。

16. インターロイキン18の前駆体タンパクをコードするDNA配列とインターロイキン1 β 変換酵素をコードするDNA配列を同時に含む組換えバキュロウイルス。

17. 配列番号：1に示すDNA配列あるいはその一部を有するDNA配列と配列番号：2に示すDNA配列あるいはその一部を有するDNA配列を同時に含む組換えバキュロウイルス。

18. 請求項6，11，12のいずれか1項記載の組換えベクターにより宿主細胞を形質転換してなる形質転換体。

19. 宿主細胞が原核細胞または真核細胞である請求項18に記載の形質転換体。

20. 請求項18または19に記載の形質転換体を培養することを特徴とするインターロイキン18の製造方法。

21. 請求項13～17のいずれか1項記載の組換えバキュロウイルスを昆虫樹立細胞中またはカイコ生体中で増殖させることを特徴とするインターロイキン18の製造方法。

22. イヌインターロイキン18を含んでなるイヌの免疫疾病治療薬。

23. イヌの免疫疾病がイヌの腫瘍、イヌのアレルギー疾病、イヌの感染症またはイヌの皮膚炎である請求項22に記載のイヌの免疫疾病治療薬。

24. イヌインターロイキン18が請求項1または2または3に記載のイヌインターロイキン18、あるいは、請求項20または21に記載の方法により得たイヌインターロイキン18であるイヌの免疫疾病治療薬。

25. イヌインターロイキン18とイヌインターロイキン12を含んでなるイヌの免疫疾病治療薬。

26. 請求項22から25のいずれか1項に記載されたイヌの免疫疾病治療薬をイヌに注射投与することを特徴とするイヌの免疫疾病治療方法。

27. イヌの腫瘍に直接注射投与することを特徴とする請求項26記載のイヌの免疫疾病治療方法。

28. 請求項22から25のいずれか1項に記載されたイヌの免疫疾病治療薬を

イヌ末梢血から分離したリンパ球に作用させた後、再びイヌ体内に戻すことを特徴とするイヌの免疫疾病治療方法。

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> 東レ株式会社 TORAY INDUSTRIES, INC.

<120> イヌインターロイキン18、イヌインターロイキン1 β 変換酵素、これらをコードするDNA配列、インターロイキン18の製造方法およびイヌの免疫疾病治療薬

<130> 9 8 0 6 1

<160> 9

<210> 1

<211> 582

<212> nucleic acid

<213> dog

<220>

<221> peptide

<222> 1..579

<400>

atg gct act aac cta ata gaa gac aat tgc atc aat ctt gtg aaa atg 48
Met Ala Thr Asn Leu Ile Glu Asp Asn Cys Ile Asn Leu Val Lys Met

aaa ttt gtt aac aat aca ctg tac ttt aaa gcg gaa agt gat gaa ggc 96
Lys Phe Val Asn Asn Thr Leu Tyr Phe Lys Ala Glu Ser Asp Glu Gly

ctg gaa tca gat tac ttt ggc aag ctt gaa cct aaa ctc tca atc ata 144
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Pro Lys Leu Ser Ile Ile

cga aat ttg aac gac caa gtc ctc ttc gtt aac gag gga aat caa cct 192
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asn Glu Gly Asn Gln Pro

gta ttt gag gat atg ccc gat tct gac tgt aca gat aat gca ccc cat 240
Val Phe Glu Asp Met Pro Asp Ser Asp Cys Thr Asp Asn Ala Pro His

acc ata ttt atc atc tat atg tat aaa gat agc ctc act aga ggt ctg 288
Thr Ile Phe Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Leu Thr Arg Gly Leu

gca gta act atc tct gtg aag tat aag aca atg tct act ctc tcc tgt 336
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Tyr Lys Thr Met Ser Thr Leu Ser Cys

aag aac aaa act att tcc ttt cag aaa atg agt cct ccg gat agt atc 384
Lys Asn Lys Thr Ile Ser Phe Gln Lys Met Ser Pro Pro Asp Ser Ile

aat gat gaa gga aat gac atc ata ttc ttt cag aga agt gtt cca ggc 432
Asn Asp Glu Gly Asn Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly

cat gat gat aag ata caa ttt gag tct tca ttg tac aaa gga cac ttt 480
His Asp Asp Lys Ile Gln Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Lys Gly His Phe

cta gct tgt aaa aaa gag aac gat ctt ttc aaa ctc att ttg aaa gac 528
Leu Ala Cys Lys Lys Glu Asn Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Asp

aag gat gaa aat ggg gat aaa tcc ata atg ttc act gtt caa aac aag 576
Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Lys

agc tag

582

Ser

<210> 2

<211> 1215

<212> nucleic acid

<213> dog

<220>

<221> peptide

<222> 1..1212

<400>

atg gcc gac aag gtc ctg aag gac aag aga agg ctg ttt gtc cgg tca 48

Met Ala Asp Lys Val Leu Lys Asp Lys Arg Arg Leu Phe Val Arg Ser

gta gac atg ggg acc atc aat ggt ttg ctg gat gaa ctc ttt gag aaa 96

Val Asp Met Gly Thr Ile Asn Gly Leu Leu Asp Glu Leu Phe Glu Lys

aga gtg ctg aac cac gag gag atg gag cga gtg cgg tgt gca cac tct 144

Arg Val Leu Asn His Glu Glu Met Glu Arg Val Arg Cys Ala His Ser

aca gtt atg gat cag gcc cga gtt ctg att gac tcc gtc ctt cgg aaa 192

Thr Val Met Asp Gln Ala Arg Val Leu Ile Asp Ser Val Leu Arg Lys

ggg cca aat gca tgc cag att ttt att tct aat att tgc aat gag gac 240

Gly Pro Asn Ala Cys Gln Ile Phe Ile Ser Asn Ile Cys Asn Glu Asp

att cac ctg gca cag acg ctg ggg ctc tcc tca ggt tca cca tct gga 288

Ile His Leu Ala Gln Thr Leu Gly Leu Ser Ser Gly Ser Pro Ser Gly

aat gat cat acc aaa cta gac tct caa gta gaa gtt cct tct tta cca 336

Asn Asp His Thr Lys Leu Asp Ser Gln Val Glu Val Pro Ser Leu Pro

gcc ttc gtg gaa aac atg cct ggg cca acc att cct gac tca gaa gaa 384

Ala Phe Val Glu Asn Met Pro Gly Pro Thr Ile Pro Asp Ser Glu Glu

tct aca gat act ctc aag ctt tgt cct cct gaa aca ttt gtg aaa atg 432

Ser Thr Asp Thr Leu Lys Leu Cys Pro Pro Glu Thr Phe Val Lys Met

tat aaa gag aag gct gaa gag atc tac cca ata aag gag aga aag gat 480

Tyr Lys Glu Lys Ala Glu Glu Ile Tyr Pro Ile Lys Glu Arg Lys Asp

cgt act cgt ctg gct ctc atc ata tgc aat ata gag ttt gat cat ctt 528

Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Ile Glu Phe Asp His Leu

tct acc agg gat gga gct gaa ctt gac att gca gga atg gag agt ctg 576

Ser Thr Arg Asp Gly Ala Glu Leu Asp Ile Ala Gly Met Glu Ser Leu

ctg gaa ggc ctg ggc tac agt gta gtt gtg aaa cgg aaa ctc act gct 624

Leu Glu Gly Leu Gly Tyr Ser Val Val Val Lys Arg Lys Leu Thr Ala

aag ggt atg gaa tca gtg tta cgg gaa ttt gcc gcc cgc cca gag cat 672

Lys Gly Met Glu Ser Val Leu Arg Glu Phe Ala Ala Arg Pro Glu His

aag tcc tca gac agc aca ttc ttg gtg tta atg tct cac ggc atc ctg 720

Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met Ser His Gly Ile Leu

aat gga atc tgt ggg acc gca cac agc gtg gaa gat cca gat gta cta 768
Asn Gly Ile Cys Gly Thr Ala His Ser Val Glu Asp Pro Asp Val Leu

gct tat gac acc atc ttc cag att ttc aac aac cgt cac tgc ctc aac 816
Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn Arg His Cys Leu Asn

ctc aag gac aaa ccg aag gtc atc atc atc cag gcc tgc aga ggt gaa 864
Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Ile Gln Ala Cys Arg Gly Glu

aat cct ggg gaa ctg tgg gtc agc gac tct cca aaa gcc tcg aca gac 912
Asn Pro Gly Glu Leu Trp Val Ser Asp Ser Pro Lys Ala Ser Thr Asp

agc tgg aca cat caa cct ctg atg ctc aag agc gat gcc att cac aag 960
Ser Trp Thr His Gln Pro Leu Met Leu Lys Ser Asp Ala Ile His Lys

gtc cac gtg gag aag gac ttc att gct ttc tgc tcc tca acc cca cat 1008
Val His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser Ser Thr Pro His

aat gtg tcc tgg aga cat atc acg aag gga tct ctt ttc att gca caa 1056
Asn Val Ser Trp Arg His Ile Thr Lys Gly Ser Leu Phe Ile Ala Gln

ctc atc aca tgc ttc caa aaa tat tcc tgg tgc tgt cac cta gaa gga 1104
Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Trp Cys Cys His Leu Glu Gly

gta ttc cgg aag gta caa caa tca ttt gaa aaa cca gat gtg aaa gcc 1152
Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Lys Pro Asp Val Lys Ala

cag atg ccg acc att gaa cga gta tcc atg aca aga tat ttc tat ctc 1200
Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Val Ser Met Thr Arg Tyr Phe Tyr Leu

ttc cct ggc aat tga

1215

Phe Pro Gly Asn

<210> 3

<211> 1427

<212> nucleic acid

<213> dog

<220>

<221> peptide

<222> 251..829

<400>

actctcaatc atacgaaatt tgaacgacca agtcctcttc gttaacgagg gaaatcaacc 60

tgtatttgag gatatgcccg attctgactg tacagataat gcaccccata ccatatttat 120

gatgctttct gcattcctgg ctgcttcagc tgccaccttt tcccatctac tcagcctcag 180

gaaaagaaag agaccttaaa ccttccagat ccttctctct tataggaaac tatcgagcac 240

aggaataaag 250

atg gct act aac cta ata gaa gac aat tgc atc aat ctt gtg aaa atg 298

Met Ala Thr Asn Leu Ile Glu Asp Asn Cys Ile Asn Leu Val Lys Met

aaa ttt gtt aac aat aca ctg tac ttt aaa gcg gaa agt gat gaa ggc 346

Lys Phe Val Asn Asn Thr Leu Tyr Phe Lys Ala Glu Ser Asp Glu Gly

ctg gaa tca gat tac ttt ggc aag ctt gaa cct aaa ctc tca atc ata 394
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Pro Lys Leu Ser Ile Ile

cga aat ttg aac gac caa gtc ctc ttc gtt aac gag gga aat caa cct 442
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asn Glu Gly Asn Gln Pro

gta ttt gag gat atg ccc gat tct gac tgt aca gat aat gca ccc cat 490
Val Phe Glu Asp Met Pro Asp Ser Asp Cys Thr Asp Asn Ala Pro His

acc ata ttt atc atc tat atg tat aaa gat agc ctc act aga ggt ctg 538
Thr Ile Phe Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Leu Thr Arg Gly Leu

gca gta act atc tct gtg aag tat aag aca atg tct act ctc tcc tgt 586
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Tyr Lys Thr Met Ser Thr Leu Ser Cys

aag aac aaa act att tcc ttt cag aaa atg agt cct ccg gat agt atc 634
Lys Asn Lys Thr Ile Ser Phe Gln Lys Met Ser Pro Pro Asp Ser Ile

aat gat gaa gga aat gac atc ata ttc ttt cag aga agt gtt cca ggc 682
Asn Asp Glu Gly Asn Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly

cat gat gat aag ata caa ttt gag tct tca ttg tac aaa gga cac ttt 730
His Asp Asp Lys Ile Gln Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Lys Gly His Phe

cta gct tgt aaa aaa gag aac gat ctt ttc aaa ctc att ttg aaa gac 778
Leu Ala Cys Lys Lys Glu Asn Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Asp

aag gat gaa aat ggg gat aaa tcc ata atg ttc act gtt caa aac aag 826
Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Lys

agc tag 832
Ser

atatgaaaat tgcagtttga attttctgag ttttcgtctt tcagaaaagg tcataaagag 892

actttgagcc ttttaattgta gtaatgaaat aaaatgaatt atagtttcaa aatataccac 952

taagaaatga ataaggggca cctgggtggc tccggcagtt gagcaccga ctcttaattt 1012

cggctcatgt catgatctca cagttgtggg atcaagcccc acgttgggct ctgcactcag 1072

catgggaggt aacctctctc cctctgcatc tgccccctcc tccactcaca cacacaggct 1132

ctctctctct taaaatgaat aattaaaata ttaaaagaaa aaataaatga ataggcaggt 1192

atcacaaaat tgaaatgagt cctccttacc caggatgaata aaatatttgt ttaacattag 1252

aagaatgtat agtttcaaaa cacattctac attgttaatt gcaacataga ttatatttgt 1312

gaagtgtttc aatcttttgg gttactagtc ctaatgacaa aagatactga taactgaact 1372

ttctaatttt taaaaaatat catlaaaaac aagattttgt agggaaaaaa aaaaa 1427

<210> 4

<211> 1560

<212> nucleic acid

<213> dog

<220>

<221> peptide

<222> 202..1413

<400>

gagaaaagag tgctgaacca cgaggagatg gagcgagtgc ggtgtgcaca ctctacagtt 60

atggatcagg cccgagttct gattgactcc gtccttcgga aagggccaaa tgcattgccag 120

atttttatttt ctaatatattg caatgaggac attcacctgg cacagacgct tagcacacat 180

caaggctgac agagacaaat c 201

atg gcc gac aag gtc ctg aag gac aag aga agg ctg ttt gtc cgg tca 249

Met Ala Asp Lys Val Leu Lys Asp Lys Arg Arg Leu Phe Val Arg Ser

gta gac atg ggg acc atc aat ggt ttg ctg gat gaa ctc ttt gag aaa 297

Val Asp Met Gly Thr Ile Asn Gly Leu Leu Asp Glu Leu Phe Glu Lys

aga gtg ctg aac cac gag gag atg gag cga gtg cgg tgt gca cac tct 345

Arg Val Leu Asn His Glu Glu Met Glu Arg Val Arg Cys Ala His Ser

aca gtt atg gat cag gcc cga gtt ctg att gac tcc gtc ctt cgg aaa 393

Thr Val Met Asp Gln Ala Arg Val Leu Ile Asp Ser Val Leu Arg Lys

ggg cca aat gca tgc cag att ttt att tct aat att tgc aat gag gac 441

Gly Pro Asn Ala Cys Gln Ile Phe Ile Ser Asn Ile Cys Asn Glu Asp

att cac ctg gca cag acg ctg ggg ctc tcc tca ggt tca cca tct gga 489

Ile His Leu Ala Gln Thr Leu Gly Leu Ser Ser Gly Ser Pro Ser Gly

aat gat cat acc aaa cta gac tct caa gta gaa gtt cct tct tta cca 537
Asn Asp His Thr Lys Leu Asp Ser Gln Val Glu Val Pro Ser Leu Pro

gcc ttc gtg gaa aac atg cct ggg cca acc att cct gac tca gaa gaa 585
Ala Phe Val Glu Asn Met Pro Gly Pro Thr Ile Pro Asp Ser Glu Glu

tct aca gat act ctc aag ctt tgt cct cct gaa aca ttt gtg aaa atg 633
Ser Thr Asp Thr Leu Lys Leu Cys Pro Pro Glu Thr Phe Val Lys Met

tat aaa gag aag gct gaa gag atc tac cca ata aag gag aga aag gat 681
Tyr Lys Glu Lys Ala Glu Glu Ile Tyr Pro Ile Lys Glu Arg Lys Asp

cgt act cgt ctg gct ctc atc ata tgc aat ata gag ttt gat cat ctt 729
Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Ile Glu Phe Asp His Leu

tct acc agg gat gga gct gaa ctt gac att gca gga atg gag agt ctg 777
Ser Thr Arg Asp Gly Ala Glu Leu Asp Ile Ala Gly Met Glu Ser Leu

ctg gaa ggc ctg ggc tac agt gta gtt gtg aaa cgg aaa ctc act gct 825
Leu Glu Gly Leu Gly Tyr Ser Val Val Val Lys Arg Lys Leu Thr Ala

aag ggt atg gaa tca gtg tta cgg gaa ttt gcc gcc cgc cca gag cat 873
Lys Gly Met Glu Ser Val Leu Arg Glu Phe Ala Ala Arg Pro Glu His

aag tcc tca gac agc aca ttc ttg gtg tta atg tct cac ggc atc ctg 921
Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met Ser His Gly Ile Leu

aat gga atc tgt ggg acc gca cac agc gtg gaa gat cca gat gta cta 969

Asn Gly Ile Cys Gly Thr Ala His Ser Val Glu Asp Pro Asp Val Leu

gct tat gac acc atc ttc cag att ttc aac aac cgt cac tgc ctc aac 1017

Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn Arg His Cys Leu Asn

ctc aag gac aaa ccg aag gtc atc atc atc cag gcc tgc aga ggt gaa 1065

Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Ile Gln Ala Cys Arg Gly Glu

aat cct ggg gaa ctg tgg gtc agc gac tct cca aaa gcc tcg aca gac 1113

Asn Pro Gly Glu Leu Trp Val Ser Asp Ser Pro Lys Ala Ser Thr Asp

agc tgg aca cat caa cct ctg atg ctc aag agc gat gcc att cac aag 1161

Ser Trp Thr His Gln Pro Leu Met Leu Lys Ser Asp Ala Ile His Lys

gtc cac gtg gag aag gac ttc att gct ttc tgc tcc tca acc cca cat 1209

Val His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser Ser Thr Pro His

aat gtg tcc tgg aga cat atc acg aag gga tct ctt ttc att gca caa 1257

Asn Val Ser Trp Arg His Ile Thr Lys Gly Ser Leu Phe Ile Ala Gln

ctc atc aca tgc ttc caa aaa tat tcc tgg tgc tgt cac cta gaa gga 1305

Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Trp Cys Cys His Leu Glu Gly

gta ttc cgg aag gta caa caa tca ttt gaa aaa cca gat gtg aaa gcc 1353

Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Lys Pro Asp Val Lys Ala

cag atg ccg acc att gaa cga gta tcc atg aca aga tat ttc tat ctc 1401

Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Val Ser Met Thr Arg Tyr Phe Tyr Leu

ttc cct ggc aat tga

1416

Phe Pro Gly Asn

aaagaataag tatcaagagc tgtiagcagg caatcatggg cagtcagct cttcttgacc 1476

aacttcaaaa aatacctitg ctaccatagc acactcatgt aacctttcgt atttcaataa 1536

aaacaaaagc aaaaaaaaaa aaaa

1560

<210> 5

<211> 40

<212> nucleic acid

<400>

aactttggcc gacttcactg tacaaccgca gtaatacggg

<210> 6

<211> 40

<212> nucleic acid

<400>

ccttcataca gtgaagattc aaactccatc ttgttggtgc

<210> 7

<211> 39

<212> nucleic acid

<400>

atggccgaca aggtcctgaa ggagaagaga aagctgttt

<210> 8

<211> 39

<212> nucleic acid

<400>

atgtcctggg aagaggtaga aacatcttgt caaagtcac

<210> 9

<211> 540

<212> nucleic acid

<213> dog

<220>

<221> sig-peptide

<222> 1..66

<221> mat-peptide

<222> 67..537

<400>

atg cat cct cag cag ttg gtc atc tcc tgg ttt tcc ctc gtt ttg ctg 48
Met His Pro Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Leu Leu

gcg tct ccc ctc atg gcc tac ttt ggc aag ctt gaa cct aaa ctc tca 96
Ala Ser Pro Leu Met Ala Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Pro Lys Leu Ser

atc ata cga aat ttg aac gac caa gtc ctc ttc gtt aac gag gga aat 144
Ile Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asn Glu Gly Asn

caa cct gta ttt gag gat atg ccc gat tct gac tgt aca gat aat gca 196

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Pro Asp Ser Asp Cys Thr Asp Asn Ala

ccc cat acc ata ttt atc atc tat atg tat aaa gat agc ctc act aga 240

Pro His Thr Ile Phe Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Leu Thr Arg

ggc ctg gca gta act atc tct gtg aag tat aag aca atg tct act ctc 288

Gly Leu Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Tyr Lys Thr Met Ser Thr Leu

tcc tgt aag aac aaa act att tcc ttt cag aaa atg agt cct ccg gat 336

Ser Cys Lys Asn Lys Thr Ile Ser Phe Gln Lys Met Ser Pro Pro Asp

agt atc aat gat gaa gga aat gac atc ata ttc ttt cag aga agt gtt 384

Ser Ile Asn Asp Glu Gly Asn Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val

cca ggc cat gat gat aag ata caa ttt gag tct tca ttg tac aaa gga 432

Pro Gly His Asp Asp Lys Ile Gln Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Lys Gly

cac ttt cta gct tgt aaa aaa gag aac gat ctt ttc aaa ctc att ttg 480

His Phe Leu Ala Cys Lys Lys Glu Asn Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu

aaa gac aag gat gaa aat ggg gat aaa tcc ata atg ttc act gtt caa 528

Lys Asp Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys Ser Ile Met Phe Thr Val Gln

aac aag agc tag

540

Asn Lys Ser

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/24, C07K14/54, C12N15/63, C12N15/57, C12N9/48, C12N7/01,
C12N5/10, C12P21/02, A61K38/20 // (C12P21/02, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/24, C07K14/54, C12N15/63, C12N15/57, C12N9/48, C12N7/01,
C12N5/10, C12P21/02, A61K38/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIL/BIOSIS (DIALOG), REG/CA (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	J. Interferon Cytokine Res. <u>17</u> (1997 Nov.) Okano F et al., "Cloning and Expression of the cDNA for Canine Interleukin-12" p.713-718	1-25
A	J. Immunol. <u>156</u> (1996) Ushio S et al., "Cloning of the cDNA for Human IFN- γ -Inducing Factor, Expression in Escherichia coli, and Studies on the Biologic Activities of the Protein" p.4274-4279	1-25
A	Nature <u>378</u> (1995) Okamura H et al., "Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells" p.88-91	1-25
A	Nature <u>356</u> (1992) Thornberry A N et al., "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes" p.768-774	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 November, 1998 (10. 11. 98)

Date of mailing of the international search report
17 November, 1998 (17. 11. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03524

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26-28
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains to methods for treatment of the animal body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/03524

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/24, C07K14/54, C12N15/63, C12N15/57, C12N9/48, C12N7/01, C12N5/10, C12P21/02, A61K38/20
// (C12P21/02, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/24, C07K14/54, C12N15/63, C12N15/57, C12N9/48, C12N7/01, C12N5/10, C12P21/02, A61K38/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIL/BIOSIS(DIALOG)

REG/CA (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	J. Interferon Cytokine Res. 17 (1997 Nov.) Okano F et al. "Cloning and Expression of the cDNA for Canine Interleukin-12" p. 713-718	1-25
A	J. Immunol. 156 (1996) Ushio S et al. "Cloning of the cDNA for Human IFN- γ -Inducing Factor, Expression in Escherichia coli, and Studies on the Biologic Activities of the Protein" p. 4274-4279	1-25
A	Nature 378 (1995) Okamura H et al. "Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells" p. 88-91	1-25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.11.98

国際調査報告の発送日

17.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nature 356 (1992) Thornberry A N et al. "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes" p.768-774	1 - 2 5

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 動物の身体の治療による処置方法に係るものである。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。